



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

⑪ Veröffentlichungsnummer:

0 194 571  
A1

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: 86102901.5

⑭ Anmeldetag: 05.03.86

⑮ Int. Cl. 4: A 61 K 31/33  
A 61 K 31/415, A 61 K 31/44  
A 61 K 31/505, A 61 K 31/53  
C 07 D 211/72, C 07 D 213/71  
C 07 D 235/28, C 07 D 249/08  
C 07 D 253/04, C 07 D 277/32

⑯ Priorität: 12.03.85 DE 3508666

⑰ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
17.09.86 Patentblatt 86/38

⑱ Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

⑲ Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT  
Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE)

⑳ Erfinder: Fleischmann, Klaus, Dr.  
In den Weingärten 24  
D-6236 Eschborn (DE)

㉑ Erfinder: Dürckheimer, Walter, Dr.  
Im Lerchenfeld 45  
D-6234 Hattersheim am Main (DE)

㉒ Erfinder: Blumbach, Jürgen, Dr.  
Manderscheider Strasse 13b  
D-6000 Frankfurt am Main 71 (DE)

㉓ Erfinder: Limbert, Michael, Dr.  
Am Alten Birnbaum 21  
D-6238 Hofheim am Taunus (DE)

㉔ Erfinder: Schorlemmer Hans-Ulrich, Dr.  
Am Kirschenwald 2  
D-3550 Marburg 21 (DE)

㉕ Erfinder: Dickneite, Gerhard, Dr.  
Zum Neuen Hieb 31  
D-3550 Marburg (DE)

㉖ Erfinder: Sedlacek, Hans-Harald, Dr.  
Sonnenhand 3  
D-3550 Marburg (DE)

㉗ Heterocyclische Disulfide und ihre Anwendung als Immunmodulatoren.

㉘ Heterocyclische Disulfide der allgemeinen Formel Heterocyclic-S-S-Heterocyclic, Verfahren zu ihrer Herstellung und insbesondere ihre Verwendung zur Immunstimulation, Immunrestoration und zytostatischen Behandlung, sowie pharmazeutische Mittel für diese Indikationen, die ein solches Disulfid enthalten

EP 0 194 571 A1

Heterocyclische Disulfide und ihre Anwendung als Immunmodulatoren.

---

Es ist bekannt, daß die Abwehrmechanismen des lebenden Organismus, die kurz als humorale Immunität und zelluläre Immunität bezeichnet werden, zusammenwirken, um Fremdkörper, die pathogenetische Veränderungen hervorrufen und 5 schädlich sein können, zu neutralisieren und zu eliminieren, vornehmlich Mikroorganismen oder neoplastische Zellen.

Immunologische Untersuchungen ergaben, daß Zusammenhänge zwischen der durch innere oder durch äußere Faktoren provo- 10 zierten Abnahme der immunologischen Aktivität und der Zunahme der Infektions- oder Tumorkrankheiten bestehen.

Daneben entstehen andere Krankheiten durch Veränderungen der Funktionen des Immunsystems. Hierzu gehören beispielsweise Autoimmunkrankheiten oder durch Immunkomplexe hervor- 15 gerufene Erkrankungen. Man sucht deshalb seit langem nach Immunstimulanten, d.h. nach Substanzen, die imstande sind, die immunologische Aktivität des Empfängers zu verändern, vorzugsweise zu erhöhen und die aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit und guten Verträglichkeit einen breiten Einsatz 20 zur Unterstützung der Abwehrkräfte des Körpers erlauben.

Beispiele, die hinsichtlich der Stimulation der Immunität geprüft wurden, sind BCG und C. parvum, ferner die Extrakte des M. tuberculosis und der Brucellen.

25 Diese Substanzen erzeugen jedoch in den Konzentrationen, wie sie zur Anwendung kommen, deutliche Nebenwirkungen, wie z.B. in verschiedenem Ausmaß lokale Granulome. Die Unkenntnis der genauen Natur der Substanzen erschwert eine systematische Untersuchung mit guter Reproduzierbarkeit der 30 klinischen Ergebnisse. Erwünscht sind somit in diesem Zusammenhang neue Immunstimulanten, die chemisch definierte Substanzen darstellen und geringe Toxizität besitzen,

wie z.B. Bestatin, das zur Zeit ein intensiv untersuchtes niedermolekulares Immunstimulanz ist und allgemein eine wissenschaftliche Referenzsubstanz darstellt.

5 Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen eine hohe immunstimulierende und immunrestorative Wirkung besitzen, wie sie sich beispielsweise in der DTH-Reaktion auf Schafserthrozyten, in der Aktivierung von mononukleären Phagozyten und in einer ausgeprägten CSF-Aktivität ausdrückt. Diese immunstimulierenden Effekte können beispielsweise auch in einer Erhöhung der Widerstandskraft gegen Infektionen beobachtet werden. Darüberhinaus besitzen die erfindungsgemäßen Verbindungen überraschenderweise zytostatische Wirksamkeit, so beispielweise gegen das B16-Melanom an der Maus.

Die vorliegende Erfindung beschreibt somit eine Klasse von immunpharmakologisch und zytostatisch wirksamen Substanzen, die chemisch definiert sind, geringe Toxizität besitzen und 20 als solche oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen wertvolle Arzneimittel darstellen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen einen LD<sub>50</sub>-Wert von mehr als 1000 mg/kg bei intravenöser Injektion bei Mäusen auf. Die wirksame immunmodulatorische und zytostatische Menge liegt bei Wirbeltieren, vorzugsweise warmblütigen Säugern, im Bereich von etwa 0,5 bis etwa 100 mg/kg Körpergewicht pro parenteraler oder oraler Gabe, ohne dabei toxische Nebenwirkungen zu zeigen und ist damit für die Behandlung von Krankheiten des Immunsystems sehr gut geeignet.

30

Die vorliegende Erfindung betrifft also die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I

Het-S-S-Het

(I)

zur Immunstimulation, Immunrestauration und zytostatischen 35 Behandlung und die Verwendung dieser Verbindungen bei der Herstellung eines Arzneimittels für diesen Verwendungszweck.

Die Erfindung betrifft ebenfalls pharmazeutische Mittel zur Immunstimulation, Immunrestauration und zytostatischen Behandlung, die eine Verbindung der allgemeinen Formel I enthalten, sowie die Verwendung eines solchen pharmazeutischen Mittels für die genannte medizinische Indikation.

In den Verbindungen der allgemeinen Formel I steht Het für einen gegebenenfalls substituierten 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus.

10

Der Heterocyclus kann z.B. 1 - 4 Heteroatome enthalten, insbesondere N, gegebenenfalls in Kombination mit S oder O.

Für Het seien beispielsweise folgende grundlegende Ringsysteme genannt: Thienyl, Furyl, Imidazolyl, Pyrazolyl, Thiazolyl, Isothiazolyl, Oxazolyl, Isoxazolyl, Triazolyl, Thiadiazolyl, Oxadiazolyl, Tetrazolyl, Pyridyl, Pyrazinyl, Pyrimidinyl, Pyridazinyl, Triazinyl sowie benzokondensierte Derivate, wie Benzoxazolyl, Benzothiazolyl und Benzimidazolyl, wobei die Ringsysteme auch ganz oder teilweise hydriert sein können, wie z.B. Dihydrotriazinyl.

Bevorzugt sind 5-gliedrige Ringsysteme mit einem Schwefel- oder Sauerstoffatom und 1 bis 2 Stickstoffatomen, wie Thiazolyl, insbesondere Thiazol-2-yl und Thiazol-5-yl, 1,3,4-Thiadiazolyl, insbesondere 1,3,4-Thiadiazol-5-yl, Oxadiazolyl, wie 1,3,4-Oxadiazol-5-yl. Bevorzugt sind weiterhin 5-gliedrige Ringsysteme mit 1 bis 4, insbesondere 2 bis 4 Stickstoffatomen, wie z.B. Imidazolyl, vorzugsweise Imidazol-2-yl, Triazolyl, vorzugsweise 1,3,4-Triazol-5-yl und 1,2,4-Triazol-5-yl. Bevorzugt sind auch benzokondensierte Derivate, insbesondere Benzoxazol-2-yl, Benzthiazol-2-yl und Benzimidazol-2-yl.

35 Weiterhin kommen vorzugsweise in Betracht 6-gliedrige Ringsysteme mit 1 bis 3, vorzugsweise 1 bis 2 Stickstoffatomen, wie z.B. Pyridyl, vorzugsweise Pyrid-2-yl, Pyrid-

3-yl und Pyrid-4-yl, Pyrimidyl, vorzugsweise Pyrimid-2-yl und Pyrimid-4-yl, Triazinyl, vorzugsweise 1,2,4-Triazin-3-yl, 2,5- und 4,5-Dihydro-1,2,4-triazin-3-yl.

5 Der Rest Het kann substituiert sein, wobei beispielsweise folgende Substituenten in Betracht kommen:

Geradkettige und verzweigte Alkylgruppen mit 1 - 6, vorzugsweise 1 - 3 C-Atomen, wie z.B. Methyl, Ethyl, n- oder 10 i-Propyl, n- oder tert.-Butyl, vorzugsweise Methyl, die gegebenenfalls wiederum substituiert sein können durch Halogen, wie beispielsweise Chlor, Brom, Hydroxyl, Alkoxy mit 1 - 4 C-Atomen, wie z.B. Methoxy, Ethoxy, Amino, Alkylamino oder Dialkylamino mit 1 - 4 C-Atomen 15 pro Alkylrest, wie z.B. Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethylamino, Mercapto, Alkylthio mit 1 - 4 C-Atomen, wie z.B. Methyl-, Ethylthio, 20 Alkoxy carbonyl mit 1 - 4 C-Atomen im Alkylteil, wie z.B. Methoxy-, Ethoxycarbonyl Aminocarbonyl, N-Alkylaminocarbonyl oder N,N-Dialkylaminocarbonyl mit 1 - 4 C-Atomen pro Alkylteil, wie z.B. N-Methyl-, N-Ethylaminocarbonyl oder N,N-Dimethyl-, N,N- 25 Diethylaminocarbonyl, Carboxy, Sulfo, Phospho, 1-H-Tetrazol-5-yl, Aryl, wie beispielsweise Phenyl, Halogen, wie beispielsweise Chlor oder Brom, Hydroxy, Oxo, Oxido, 30 Alkoxy mit 1 - 4 C-Atomen, wie z.B. Methoxy, Ethoxy, Amino, Alkylamino oder Dialkylamino mit 1 - 4 C-Atomen pro Alkylteil, wie z.B. Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethylamino oder Acylamino, wobei Acyl für den Rest einer aliphatischen Mono- oder Dicarbonsäure mit 2 - 5 35 C-Atomen stehen kann, wie z.B. Acetyl, Propionyl, 3-Carboxy-propionyl, 4-Carboxy-butyryl, vorzugsweise Acetyl,

Alkylthio, Alkenylthio und Alkinylthio mit 1 - 4 C-Atomen im Alkyl- und 2 - 4 C-Atomen im Alkenyl und Alkinylteil, wie z.B. Methyl-, Ethyl-, Vinyl-, Allyl-, Ethinyl- oder Propinylthio, die gegebenenfalls substituiert sein können durch Carboxy, Sulfo, Phospho, 1-H-Tetrazol-5-yl oder Aminocarbonyl,

5 Alkenyl mit 2 - 4 C-Atomen, wie z.B. Vinyl, Allyl, die gegebenenfalls substituiert sein können durch Halogen, wie beispielsweise Chlor, Brom,

10 Hydroxy,

Alkoxy mit 1 - 4 C-Atomen, wie z.B. Methoxy, Ethoxy,

Alkoxycarbonyl mit 1 - 4 C-Atomen im Alkylteil, wie z.B. Methoxy-, Ethoxycarbonyl,

15 Aminocarbonyl, N-Alkylaminocarbonyl,

N,N-Dialkylaminocarbonyl mit 1 - 4 C-Atomen pro Alkylteil, wie z.B. N-Methyl-, N-Ethylaminocarbonyl oder N,N-Dimethyl-, N,N-Diethylaminocarbonyl,

Carboxy, Sulfo, Phospho, 1-H-Tetrazol-5-yl,

20 Carboxy oder

Alkoxycarbonyl mit 1 - 4 C-Atomen im Alkylteil, wie z.B. Methoxy-, Ethoxycarbonyl.

Innerhalb der allgemeinen Formel I umfaßt die erfindungsgemäße Verwendung auch neue Verbindungen.

25 Die vorliegende Erfindung betrifft demnach auch neue niedermolekulare heterocyclische Disulfide der allgemeinen Formel I'



30 in der Het' für ein 5-gliedriges Ringsystem mit einem Schwefel und 1 bis 2 Stickstoffatomen oder mit 1 - 3 Stickstoffatomen steht, wie beispielsweise Thiazolyl, insbesondere Thiazol-2-yl und Thiazol-5-yl,

35 1,3,4-Thiadiazolyl, insbesondere 1,3,4-Thiadiazol-5-yl, Imidazolyl, insbesondere Imidazol-2-yl und Triazolyl, insbesondere 1,2,4-Triazol-5-yl. Bevorzugt sind auch benzo-

kondensierte Derivate, insbesondere Benzthiazol-2-yl und Benzimidazol-2-yl.

Het' kann auch stehen für ein 6-gliedriges Ringsystem mit 1 bis 3 Stickstoffatomen, wie beispielsweise Pyridyl, vorzugsweise Pyrid-2-yl, Pyrimidyl, vorzugsweise Pyrimid-2-yl und Triazinyl, vorzugsweise 1,2,4-Triazin-3-yl, wobei die Ringsysteme auch ganz oder teilweise hydriert sein können, wie z.B. Dihydrotriazinyl.

10

Der Rest Het' kann substituiert sein, wobei beispielsweise folgende Substituenten in Betracht kommen:

15 Geradkettige und verzweigte Alkylgruppen mit 1 - 6, vorzugsweise 1 - 3 C-Atomen, wie z.B. Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl, n- oder tert.-Butyl, vorzugsweise Methyl, die gegebenenfalls wiederum substituiert sein können durch

Halogen, wie beispielsweise Chlor, Brom,

Hydroxyl,

Alkoxy mit 1 - 4 C-Atomen, wie z.B. Methoxy, Ethoxy,

20 Amino, Alkylamino oder Dialkylamino mit 1 - 4 C-Atomen pro Alkylrest, wie z.B. Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethylamino,

Mercapto,

Alkylthio mit 1 - 4 C-Atomen, wie z.B. Methyl-,

25 Ethylthio,

Alkoxycarbonyl mit 1 - 4 C-Atomen im Alkylteil, wie z.B. Methoxy-, Ethoxycarbonyl,

Aminocarbonyl, N-Alkylaminocarbonyl oder N,N-Dialkylaminocarbonyl mit 1 - 4 C-Atomen pro Alkylteil, wie z.B.

30 N-Methyl-, N-Ethyl-, N,N-Dimethyl-, N,N-Diethyl-amino-carbonyl,

Carboxy, Sulfo, Phospho, 1-H-Tetrazol-5-yl,

Aryl, wie beispielsweise Phenyl,

Halogen, wie beispielsweise Chlor oder Brom,

35 Hydroxy, Oxo, Oxido,

Alkoxy mit 1 - 4 C-Atomen, wie z.B. Methoxy, Ethoxy,

Amino, Alkylamino oder Dialkylamino mit 1 - 4 C-Atomen pro

Alkylteil, wie z.B. Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-  
Diethylamino oder Acylamino, wobei Acyl für den Rest  
einer aliphatischen Mono- oder Dicarbonsäure mit 2- 5  
C-Atomen stehen kann, z.B. Acetyl, Propionyl,  
5 3-Carboxy-propionyl, 4-Carboxy-butyryl, vorzugsweise  
Acetyl,  
Alkylthio, Alkenylthio und Alkinylthio mit 1 - 4 C-Atomen im  
Alkyl- und 2 - 4 C-Atomen im Alkenyl- und Alkinylteil,  
wie z.B. Methyl-, Ethyl-, Vinyl-, Allyl-, Ethinyl-,  
10 Propinylthio, die gegebenenfalls substituiert sein kön-  
nen durch Carboxy, Sulfo, Phospho, 1-H-Tetrazol-5-yl  
oder Aminocarbonyl,  
Alkenyl mit 2 - 4 C-Atomen, wie z.B. Vinyl, Allyl, die ge-  
gebenenfalls substituiert sein können durch Halogen, wie  
15 beispielsweise Chlor, Brom,  
Hydroxy,  
Alkoxy mit 1 - 4 C-Atomen, wie z.B. Methoxy, Ethoxy,  
Alkoxycarbonyl mit 1 - 4 C-Atomen im Alkylteil, wie z.B.  
Methoxy-, Ethoxycarbonyl,  
20 Aminocarbonyl, N-Alkylaminocarbonyl, N,N-Dialkylamino-  
carbonyl mit 1 - 4 C-Atomen pro Alkylteil, wie z.B. N-  
Methyl-, N-Ethyl-, N,N-Dimethyl-, N,N-Diethyl-amino-  
carbonyl  
Carboxy, Sulfo, Phospho, 1-H-Tetrazol-5-yl,  
25 Carboxy oder  
Alkoxycarbonyl mit 1 - 4 C-Atomen im Alkylteil, wie z.B.  
Methoxy-, Ethoxycarbonyl.

Die Heterocyclen Het und Het' können in der vorstehend be-  
30 schriebenen Weise ein- oder mehrfach, beispielsweise ein-  
bis dreifach substituiert sein. Bevorzugt sind jedoch  
Heterocyclen Het und Het', die im heterocyclischen oder im  
ankondensierten carbocyclischen Ring einen oder 2  
35 Substituenten tragen. Besonders bevorzugt sind solche, bei-  
denen von diesen Substituenten mindestens einer eine saure  
Gruppe trägt, insbesondere eine Carboxygruppe, wie bei-  
spielsweise Carboxyalkyl oder Carboxyalkylthio.

Weiterhin bevorzugt sind Heterocyclen Het und Het', die im heterocyclischen Teil oder im ankondensierten carbocyclischen Ring einen oder zwei Substituenten tragen, von denen mindestens einer eine direkt gebundene saure Gruppe 5 ist, wie beispielsweise Carboxy oder Hydroxy.

Sind die Substituenten am Heterocyclus Het und Het', wie z.B. Alkyl, Alkenyl, Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylthio, in der oben beschriebenen Weise noch weiter substituiert, so 10 können sie auch mehr als einen Substituenten, beispielsweise 1 - 3 weitere Substituenten tragen. Bevorzugt ist jedoch ihre einfache Substitution.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt sind Verbindungen, in 15 denen Het bzw. Het' für einen Thiazolrest steht, der mindestens durch eine Carboxyl- oder eine Carboxymethylgruppe substituiert ist.

Sofern die Verbindungen der Formeln I und I' saure 20 Funktionen tragen, können sie auch in Form ihrer physiologisch verträglichen Salze vorliegen, beispielsweise als Alkali- und Erdalkalisalze, wie vorzugsweise die Na, K, Ca, Mg-Salze oder beispielsweise Ammoniumsalze oder substituierte Ammoniumsalze, wie beispielsweise  $\text{NH}_4^+$ , Ethanol- 25 ammonium, Diethanolammonium, Trialkylammonium, wie z.B. Triethylammonium, Tetraalkylammonium, Salze mit basischen Aminosäuren, wie z.B. Lysin, Arginin.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur 30 Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I'.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung der Formel II

in der Het' die oben angeführte Bedeutung hat, durch Umsetzung mit einem Oxidationsmittel in die erfindungsgemäßen Verbindungen überführt und gegebenenfalls die oben genannten erfindungsgemäßen Substituenten von Het' in ande-  
5 re der oben genannten erfindungsgemäßen Substituenten von Het' überführt.

Als Oxidationsmittel seien beispielsweise genannt Sauerstoff, Wasserstoffperoxid, u.U. unter Zusatz von  
10 Eisensalzen, wie beispielsweise Mohr'schem Salz oder unter Zusatz von Basen, wie beispielsweise Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Natriumhydrogencarbonat oder Kaliumhydrogencarbonat, organische Persäuren, wie beispielsweise Peressigsäure, Perbenzoësäure oder m-Chlorperbenzoësäure, elementares Jod oder Brom, u.U. unter Zusatz von Basen, wie beispielsweise Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid, FeCl<sub>3</sub> oder K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>).

Als Oxidationsmittel seien als bevorzugt genannt  
20 Sauerstoff, Wasserstoffperoxid, organische Persäuren, wie beispielsweise Peressigsäure, Perbenzoësäure und m-Chlorperbenzoësäure und elementares Jod. Die Oxidation wird bevorzugt in Wasser oder einem organischen Lösungsmittel durchgeführt, wie beispielsweise Methanol, Ethanol, iso-Propanol, Essigester und halogenierten Kohlenwasserstoffen, wie beispielsweise Dichlormethan und Chloroform. Es kann auch ein Gemisch dieser Lösungsmittel eingesetzt werden. Beim Arbeiten mit Sauerstoff, Wasserstoffperoxid und Persäuren ist die Verwendung von  
25 Lösungsmitteln, die bekanntermaßen explosive Peroxide bilden können, wie beispielsweise Ether, Tetrahydrofuran, Dioxan, Aceton, Methylethylketon, iso-Propanol usw., zu vermeiden.  
30 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch hergestellt werden, indem man eine Verbindung der Formel III

Het'-X

(III)

in der Het' die oben angeführte Bedeutung hat und X für eine reaktive Abgangsgruppe, wie Halogen, bevorzugt Chlor 5 oder Brom, wie  $-\text{OSO}_2\text{R}$ , wobei R die Bedeutung von bevorzugt Methyl, Trifluormethyl, Phenyl, Tollyl oder Naphthyl hat, wie  $-\text{OPO}(\text{OR}')_2$ , wobei R' die Bedeutung von bevorzugt Phenyl hat, steht, mit  $\text{Me}_2\text{S}_2$  umsetzt, wobei Me für ein Alkali- 10 metall, vorzugsweise Natrium steht und gegebenenfalls die oben genannten erfindungsgemäßen Substituenten von Het' in andere der oben genannten erfindungsgemäßen Substituenten von Het' überführt.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Verbindungen hergestellt werden, indem man eine Verbindung der Formel IV 15

Het' $\text{SSO}_2\text{Me}$

(IV)

in der Het' und Me die oben angeführten Bedeutungen haben 20 mit Jod in wässrigem Medium umsetzt und gegebenenfalls die oben genannten erfindungsgemäßen Substituenten von Het' in andere der oben genannten erfindungsgemäßen Substituenten von Het' überführt.

25 Die Umsetzung kann in einem Temperaturbereich zwischen etwa  $-40^\circ\text{C}$  und dem Siedepunkt des Lösungsmittels bzw.

Lösungsmittelgemisches, bevorzugt zwischen etwa  $-10^\circ\text{C}$  und etwa  $+40^\circ\text{C}$  durchgeführt werden.

30 Es ist ganz allgemein möglich, in den Disulfiden der Formel I' im Heterocyclus Het' enthaltene Substituenten nach literaturbekannten Verfahren in andere erfindungsgemäße Substituenten zu überführen. So kann beispielsweise eine Alkoxy carbonyl- oder Aminocarbonylgruppe durch Verseifung, 35 oder im Falle der Aminocarbonylgruppe auch durch Nitrosierung in eine freie Carboxylgruppe umgewandelt werden.

Der Wirkstoff kann allein gegeben oder aber auch mit einem oder mehreren, vorzugsweise einem anderen Arzneimittel kombiniert werden, die Infektionen, die beispielsweise durch Bakterien, Pilze oder Viren hervorgerufen werden, und

5 Tumorkrankheiten günstig beeinflussen. Die Wirkstoffe können erfindungsgemäß sowohl parenteral als auch oral verabreicht werden. Für die parenterale Verabreichung kommen Lösungen oder Suspensionen des Wirkstoffes in einem pharmazeutisch verträglichen Vektor in Betracht, vorzugsweise

10 Pflanzenöl, wie z.B. Erdnußöl oder Sesamöl, sowie alkoholische Lösungen des Wirkstoffes, z.B. in Ethanol, Propandiol oder Glycerin oder in Gemischen der vorgenannten Lösungsmittel. Zur Herstellung wässriger Lösungen wird der Wirkstoff vorzugsweise in Form wasserlöslicher, physiologisch verträglicher Salze eingesetzt. Die Zubereitungen können die üblichen Hilfs- und Trägerstoffe enthalten. Als solche kommen beispielsweise Füllstoffe, Emulgatoren, Gleit- und Pufferstoffe und geschmackskorrigierende Agenzien in Frage.

20

Im folgenden wird die Einwirkung der Verbindungen auf die Immunantwort der Maus und ihre immunstimulierenden Aktivitäten in verschiedenen in vivo-Standardmethoden beispielhaft erläutert. Die herangezogenen verschiedenen Testmethoden sind bekanntermaßen für die Beurteilung von Immunstimulantien und deren Wirkqualität besonders gut geeignet.

Experiment 1

Wirkung auf die zelluläre immunologische Reaktion vom verzögerten Typ gegen Schafserozyten (delayed type hypersensitivity, DTH)

Es wurden Gruppen von 5 weiblichen NMRI-Mäusen mit einem Gewicht von 18 - 20 g intravenös entweder  $10^6$  oder  $10^9$  rote Blutkörperchen vom Schaf pro Tier verabreicht. Schafserozyten gelten in der Immunologie als Standardprüfstoff (Antigen) zur Auslösung von zellulären und humoralen Immunreaktionen. Im besonderen gibt dieser Test Auskunft über die Funktionsfähigkeit der T-Zell-abhängigen Komponente (T-Helferzellen) des Immunsystems. Die gemäß Ausführungsbeispiel 8 erhaltene Prüfsubstanz (Bis-(5-Carboxymethyl-4-methyl-thiazol-2-yl)-disulfid) wurde an den Tagen -3, -2, -1 und 0 in den Konzentrationen 20 mg/kg, 30 mg/kg und 40 mg/kg in physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal zweimal täglich appliziert. Nach 5 Tagen wurden allen Tieren jeweils  $2 \times 10^8$  Schafserozyten in die Fußsohle injiziert und 24 Stunden später wurde die Schwellung des Fußes gemessen. Die Fußschwellung wird durch eine Hautreaktion vom verzögerten Typ (delayed type hypersensitivity, DTH) ausgelöst und ist, wie dem Fachmann bekannt, ein Maß für die zelluläre Immunantwort (Collins, F.M. und Mackaness, G.B., J. Immunol. 101, 830-845, 1968). Die in der Tabelle 1 zusammengestellten Ergebnisse veranschaulichen, daß es durch die Verabfolgung der erfindungsgemäß erhaltenen Substanz beispielsweise nach Immunisierung mit  $10^6$  Schafserozyten, zur Steigerung der zellulären Immunantwort kommt. Ein Maximum der Stimulation kann in diesem Experimentalansatz bei der Gabe von 30 mg/kg Prüfsubstanz beobachtet werden.

Tabelle 1

Immunisierung von Mäusen mit Schafserozyten-Wirkung auf die zelluläre Immunantwort (DTH-Reaktion)

			% Fußschwellung bei
			$10^6$ Erythrozyten
5	2x/Tag i.p. Applikation an Tag -3, -2, -1, 0 von		
	PBS*		24,3 $\pm$ 1,3
	20 mg/kg		28,3 $\pm$ 6,7
	Prüfsubstanz 30 mg/kg		36,5 $\pm$ 6,5
10	40 mg/kg		31,4 $\pm$ 8,7

\* PBS = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (NaCl:8000 mg/l, KCl: 200 mg/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O: 1440 mg/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:200 mg/l

Experiment 2

15 Einfluß auf die Stimulation der unspezifischen Immunität - Aktivierung von mononukleären Phagozyten

Hier wurde der Einfluß der nach Ausführungsbeispiel 8 erhaltenen Prüfsubstanz auf die Stimulation von Peritoneal-20 makrophagen bei 6- 8 Wochen alten NMRI-Mäusen untersucht. Mäuseweibchen erhielten auf parenteralem oder oralem Wege die Prüfsubstanz in einer Dosis von 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg und 200 mg/kg. Der Kontrollgruppe wurde gepufferte Kochsalzlösung verabreicht. Drei Tage nach den Injektionen 25 wurden die Mäuse getötet, und es wurden die Peritoneal-makrophagen der Tiere auf ihren Aktivierungszustand hin untersucht. Als Maß der Makrophagenaktivierung wurde zum einen die Sekretion der lysosomalen Enzyme ( $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Glucuronidase, N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase) bestimmt. Auf 30 der anderen Seite konnte in vergleichbaren Makrophagen-kulturen die Pinozytose durch die Aufnahme von kolloidalem Gold (<sup>198</sup>Au) - wie sie dem Fachmann bekannt ist - untersucht werden. Die Höhe des oxidativen Stoffwechsels bei Makrophagen gilt als ein weiteres Maß für ihren 35 Aktivierungszustand. Gemessen wird diese Aktivität unter Zuhilfenahme des Biolumaten durch Bestimmung der Chemolumineszenz.

Zu diesem Zweck wurden entweder in Petrischalen von 30 mm Durchmesser  $3 \times 10^6$  Makrophagen mit 1 ml TC 199-Kulturmedium oder aber  $10^6$  Makrophagen mit 100  $\mu$ l in Rundbogen-Polyäthylen-Röhrchen (zur Bestimmung der Chemolumineszenz) 5 bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert.

Nach einstündiger Bebrütung wurden die Kulturen gewaschen, um schwimmende Zellen zu entfernen. Die Chemolumineszenz (Röhrchenkultur) wurde dann direkt bestimmt, während die 10 Petrischalen erneut 24 Stunden bei 37°C bebrütet wurden und danach die Enzym- und Pinozytoseaktivität in den Kulturen bestimmt wurde. Es wurden die nachstehenden Ergebnisse erzielt.

15 Tabelle 2

Wirkung auf den oxidativen Stoffwechsel bei Maus-Peritonealmakrophagen (Chemolumineszenz in RLE\*/15Minuten).

	1 x Applikation	intraperitoneal	oral
20	von		
	PBS	$2,97 \pm 0,28 \times 10^5$	$3,65 \pm 0,81 \times 10^5$
	Prüf- 25 mg/kg	$7,87 \pm 0,28 \times 10^5$	$6,41 \pm 0,42 \times 10^5$
	substanz 50 mg/kg	$9,72 \pm 0,82 \times 10^5$	$8,99 \pm 0,39 \times 10^5$
	100 mg/kg	$12,85 \pm 2,37 \times 10^5$	$11,85 \pm 0,92 \times 10^5$
25	200 mg/kg	$24,40 \pm 3,39 \times 10^5$	$15,60 \pm 1,98 \times 10^5$

\*RLE = Relative Lichteinheiten

Die parenterale sowie die orale Behandlung von NMRI-Mäusen mit der gemäß Beispiel 8 hergestellten Prüfsubstanz stimuliert die Makrophagenaktivität und hat damit eine immunitätstimulierende Wirkung. So wird der oxidative Stoffwechsel bei Makrophagen mit der Generierung von Sauerstoffradikalen und dem damit verbundenen meßbaren Licht deutlich erhöht. Bei Dosierungen von 25 mg/kg aufwärts kommt es zu einer dosisabhängigen Steigerung der Makrophagenaktivität sowohl bei parenteraler als auch oraler Applikation.

Aus der Tabelle 3 ist zu entnehmen, daß Makrophagen von Kontrollmäusen nur geringe Mengen an lysosomalen Enzymen ( $\beta$ -Glucuronidase,  $\beta$ -Galactosidase, N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase) in den Kulturüberstand abgeben. Mononukleäre Phagozyten von Mäusen, die parenteral oder oral mit der Prüfsubstanz 72 Stunden behandelt wurde, sezernieren die o.a. sauren Hydrolasen ( $\beta$ -Glu,  $\beta$ -Gal, N-Ac-Glu) deutlich mehr und weisen damit eine Dosiswirkungskurve auf, die bei allen gemessenen Enzymen eine Überlegenheit gegenüber den Kontrollen erkennen läßt. Es ist ersichtlich, daß die Prüfsubstanz eine stimulierende Wirkung auf die Makrophagenaktivität besitzt und zur Erhöhung der Enzymfreisetzung beiträgt.

15 Tabelle 3

Einfluß der Prüfsubstanz auf die Enzymfreisetzung lysosomaler Hydrolasen von Maus-Peritonealmakrophagen.

	1 x i.p./p.o.	$\beta$ -Glu mU/ml	$\beta$ -Gal mU/ml	N-Ac-Glu mU/ml
20	<u>Applikation</u>			
PBS		755/ 484	1306/ 1702	1238/1168
	25 mg/kg	1001/ 897	2584/ 4917	2786/1947
Prüf- substanz	50 mg/kg	1370/1133	11058/ 9179	3315/2862
	100 mg/kg	1791/1593	17596/13195	4305/3676
25		200 mg/kg	2136/1886	22351/17357
				6548/5621

Die quantitative Bestimmung der Pinozytoseaktivität bei mononukleären Phagozyten wurde nach der Methode von Davies et al. durchgeführt (Davies, P. Allison, A.C. und Haswell, 30 A.D.; Biochem. Biophys. Res. Com. 52, 627, 1973). Dazu wurde radioaktives, kolloidales Gold ( $^{198}\text{Au}$ ) mit einer Partikelgröße von 20 nm und einer spezifischen Aktivität von 4-12  $\text{mCi}/\text{mg}$  Au benutzt. Die Ergebnisse in Tabelle 4 veranschaulichen den Effekt der nach Beispiel 8 erhaltenen 35 Prüfsubstanz auf die Endozytoseleistung. Die Pinozytose von kolloidalem Gold ( $^{198}\text{Au}$ ) durch Maus-Peritonealmakrophagen von mit der erfindungsgemäßen Verbindung behandelten Tieren

ist im Vergleich mit den Makrophagen von unbehandelten Tieren signifikant und dosisabhängig erhöht.

Tabelle 4

5 Der Effekt der Prüfsubstanz auf die Pinozytoseleistung von Mausmakrophagen.

1 x Applikation von		intraperitoneal		oral	
PBS		0,286	$\times 10^3$	0,198	$\times 10^3$
10	25 mg/kg	0,341	" "	0,272	" "
Prüf-	50 mg/kg	0,396	" "	0,358	" "
substanz	100 mg/kg	0,462	" "	0,416	" "
	200 mg/kg	0,587	" "	0,506	" "

15 Experiment 3

Erhöhung der Widerstandskraft von Balb/c-Mäusen gegen eine Candida albicans Infektion

20 a) Prophylaktische Behandlung:

Balb/c-Mäuse wurden über 4 Tage in einer Dosierung von 2 x 60 mg/kg/Tag intraperitoneal mit der Prüfsubstanz (Verbindung nach Ausführungsbeispiel 8) behandelt. 24 Stunden nach der letzten Gabe der Prüfsubstanz werden diese Tiere und die Kontrolltiere, denen physiologische Kochsalzlösung in gleichen Volumina und Zeitabständen verabreicht worden war, mit Candida albicans intravenös infiziert ( $5 \times 10^5$  CFU/Maus). Aus der Absterberate nach der Infektion lassen sich entsprechend die mittleren Überlebenszeiten berechnen. Die Tiere der Kontrollgruppe sterben zu 50 % nach 9,7 Tagen, die mit der Prüfsubstanz behandelte Gruppe zeigte eine mittlere Überlebenszeit von 16,1 Tagen. In dem gewählten Applikationsschema mit den entsprechenden Dosierungen (prophylaktische Verabreichung) induziert die Prüfsubstanz eine signifikante Erhöhung der Resistenz der Balb/c-Maus gegen Candida albicans.

Tabelle 5

Mittlere Überlebenzeiten nach *C. albicans* Infektion  
( $5 \times 10^5$  CFU)

5	Substanz 2 x 60 mg/kg/ Tag i.p.	mittlere Überlebens- zeit (Tage)	Vertrauensbereich	
			95 %	99 %
	PBS	9,7	8,4-10,6	7,8-10,9
	Prüfsubstanz	16,1	14,8-17,4	14,4-17,8

10

b) Therapeutische Behandlung:

Bei der therapeutischen Behandlung einer chronischen *Candida albicans* Infektion wurden weibliche Balb/c-Mäuse (15/Gruppe) am Tag 0 intravenös mit *Candida albicans* ( $1 \times 10^5$  CFU/Maus) infiziert. Nach erfolgter Infektion wurden die Tiere an 8 aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 3 - 10) mit jeweils 60 mg/kg der Prüfsubstanz (Verbindung nach Ausführungsbeispiel 8) intraperitoneal behandelt. Den Kontrolltieren wurde physiologische Kochsalzlösung injiziert. An den Tagen 8, 14 und 21 wurden den Tieren Urin entnommen und die Keimzahl bestimmt. Am Tag 30 wurden die Tiere getötet und die Keimzahl und die Nekrosenbildung der Nieren bestimmt. Die Tabelle 6 zeigt, daß die Prüfsubstanz bei therapeutischer Gabe deutlich alle Parameter der chronischen *Candida albicans* Infektion (Keimzahl in Urin und Nieren und Nekrosenbildung) reduziert und damit die Erkrankung therapeutisch beeinflußt. Während bei den Kontrolltieren sich zu einem hohen Prozentsatz Keime im Urin nachweisen lassen, wird bei den behandelten Tieren die Keimzahl signifikant erniedrigt.

Auch die Keimbesiedlung der Nieren wird durch die Therapie von 63 % auf 27 % reduziert, bei einer gleichzeitigen Verringerung der Nekrosenbildung von 87 % auf 10 %.

Tabelle 6

Therapeutische Behandlung einer chronischen *Candida albicans* Infektion ( $1 \times 10^5$  CFU)

5	Substanz 60 mg/kg i.p.	Tiere mit positivem Befund		Nieren mit nekro- positivem tische Keimbefund Nieren		
		Tag 3-10	Tag 8	Tag 14	Tag 21	Tag 30
	PBS	4/15	8/15	10/15	19/30	26/30
10		(27 %)	(53 %)	(67 %)	(63 %)	(87 %)
	Prüf- substanz	1/15 ( 7 %)	1/15 ( 7 %)	4/15 (27 %)	8/30 (27 %)	3/30 (10 %)

15

Experiment 4

Stimulation der DTH-Reaktion durch die erfindungsgemäßen  
Verbindungen

20

Wie in Experiment 1 beschrieben, wurden NMRI-Mäuse mit den erfindungsgemäßen Substanzen behandelt.

25

Als Test zur Erfassung der Immunstimulation wurde die DTH-Reaktion überprüft.

30

Tabelle 7 zeigt die relative Wirksamkeit der Prüfsubstanz, bezogen auf die Verbindung aus Beispiel 8, deren maximale Aktivierung 100 % entspricht (Differenz zwischen Kontrolle und Stimulation). Der Tabelle ist zu entnehmen, daß die DTH-Reaktion bei den mit den Prüfsubstanzen vorbehandelten Tieren deutlich stärker ausgeprägt ist, als bei den entsprechenden Kontrolltieren.

Tabelle 7

Beispiel Nr.	Verbindung aus Beispiel Nr.	Dosis (mg/kg)	Applikation	DTH-Reaktion	
				(SRBC)	
5	2	20	1 x i.p. Tag 0	88 %	
	5	200	"	61 %	
	6	100	"	100 %	
	8	100	"	100 %	
	10	10	"	112 %	
10	12	100	"	96 %	
	13	200	"	147 %	
	14	100	"	118 %	

Experiment 5

15

Stimulation der Makrophagenaktivität durch die erfindungsgemäßen Verbindungen

Wie im Experiment 2 beschrieben, wurden NMRI-Mäuse mit den  
20 erfindungsgemäßen Verbindungen behandelt.

Als Test zur Erfassung der Immunstimulation wurde die  
Funktion der Makrophagen (Chemolumineszenz und Enzym-  
aktivität) überprüft.

25

Tabelle 8 zeigt die relative Wirksamkeit der Prüfsubstanzen  
bezogen auf die Verbindung aus Beispiel 8, deren maximale  
Aktivierung (Differenz zwischen Kontrolle und Stimulation)  
100 % entspricht. Der Tabelle ist zu entnehmen, daß im  
30 Vergleich zu Makrophagen aus unbehandelten Tieren, diese  
Zellen auch durch alle Prüfsubstanzen in ihrer  
Chemolumineszenzreaktion stark stimuliert und in ihrem  
Gehalt an lysosomalen Enzymen deutlich erhöht waren.

Tabelle 8

5	Beispiel Nr. (100 mg/kg i.p.)	Makrophagenaktivität	
		Chemolumineszenz	Exozytose
	1	30 %	48 %
	2	72 %	53 %
	5	37 %	45 %
	6	26 %	33 %
10	8	100 %	100 %
	10	66 %	21 %
	12	39 %	54 %
	13	81 %	77 %
	14	97 %	93 %

15

Experiment 6

20 Stimulation der Infektabwehr gegen Candida albicans Infektionen durch prophylaktische Gabe der erfindungsgemäßen Verbindungen

Wie in Experiment 3a beschrieben, wurden Balb/c-Mäuse mit den erfindungsgemäßen Verbindungen behandelt.

25 Wie Tabelle 9 zeigt, steigt die mittlere Überlebenszeit der Mäuse nach C. albicans Infektion, verglichen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe, signifikant an.

Tabelle 9

Beispiel Nr.	Dosis (mg/kg)	Relative Verlängerung der mittleren Überlebenszeiten *
5	1 x i.p. Tag	post inf.
1	1	144
2	1	123
5	10	142
6	10	145
10	8	130
	10	135
	12	205
	14	107

15 \*Mittlere Überlebenszeit der Kontrollgruppe = 100

#### Experiment 7

##### Einfluß auf die Stimulation der Tumorabwehr gegen das B16-Melanom

Bei weiblichen C57Bl/6 Mäusen (10 Tiere/Gruppe) mit einem Gewicht von 18 - 20 g wurde mit  $2 \times 10^5$  lebenden B16-Melanomzellen ein Primärtumorwachstum induziert. Nach 25 Ausprägung einer bestimmten Tumogröße (0.65 cm im Durchmesser) wurde der Primärtumor entfernt. Die unbehandelten Tiere starben dann an Metastasen in der Lunge. Nach der Tumorinduktion wurden die Tiere an den Tagen 3, 5, 7, 9, 11, und 13 nach Amputation des Primärtumors mit 50, 100 30 und 200 mg/kg der nach Beispiel 8 erhaltenen Prüfsubstanz intraperitoneal behandelt. Aus der Absterberate nach Amputation des Primärtumors durch die Entwicklung von Lungenmetastasen lassen sich entsprechend die mittleren Überlebenszeiten berechnen. Danach sterben die Tiere der 35 Kontrollgruppe zu 50 % nach 26 Tagen. Die mit der Prüfsubstanz behandelten Gruppen zeigten (vgl. Tabelle 10) mit den entsprechenden Dosierungen eine signifikante

Erhöhung der mittleren Überlebenszeit auf 43, 40 und 35 Tage.

Tabelle 10

5

Therapeutische Tumor-Behandlung beim B16-Melanom

	Applikation 6 x i.p. (mg/kg)	mittlere Überlebenszeit (Tage)
	Tag 3, 5, 7, 9, 11, 13	
10	PBS	26
	50	43
	Prüfsubstanz 100	40
	200	35

15 Experiment 8

Einfluß auf die Knochenmarkskoloniebildung

Hier wurde der Einfluß der nach Beispiel 8 erhaltenen  
20 Prüfsubstanz auf die Stimulation von Knochenmarkskolonien  
bei 6 - 8 Wochen alten B2D2F1 Mäusen untersucht.  
Mäuseweibchen erhielten die Prüfsubstanz intraperitoneal in  
den Dosen 2,5 und 5 mg/kg. Einen Tag später wurden die  
Tiere getötet, die Knochenmarkzellen isoliert und nach den  
25 allgemein bekannten Methoden (Metcalf, Immunology 21, 427,  
1971 und Stanley et al. J. Exp. Med. 143, 631, 1979)  
kultiviert. Zur Entwicklung der Knochenmarkskolonien wurde  
als "CSF"-Quelle (Colony stimulating factor) wie üblich  
L-Zell-Überstand (15 %) benutzt. Die Kolonien wurden 8 Tage  
30 nach der Aussaat gezählt. Wie aus der Tabelle 11 zu er-  
sehen ist, führt die einmalige Gabe von 2,5 oder 5 mg der  
Prüfsubstanz zu einer deutlichen Steigerung der  
Koloniebildung bei Knochenmarkszellen sowohl mit als auch  
ohne Zugabe von CSF (Colony stimulating factor) in vitro.

Tabelle 11

In vivo-Effekt auf die Knochenmarkskoloniebildung

5	Prüfsubstanz 1 x i.p. (mg/kg)	Zahl der Knochenmarkskolonien (Tag 8)		
		mit CSF (15 %)	ohne CSF (15 %)	
	PBS	41 ± 6	0	
	Prüf- substanz	94 ± 11	24 ± 2	
	5,0	163 ± 8	44 ± 5	

10

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne sie jedoch einzuschränken.

Beispiel 1Bis-(3Hydroxy-1-phenyl-1,2,4-triazol-5-yl)-disulfid

2,9 g (15 mmol) 3-Hydroxy-1-phenyl-5-mercaptop-1,2,4-triazol werden in

100 ml Methanol vorgelegt und bei Raumtemperatur

3,2 ml (33 mmol) Wasserstoffperoxid 35 %ig in Methanol

5 zugetropft. Die Lösung färbt sich zunächst gelb und nach 20 Min. fällt die neue Verbindung langsam aus. Nach vier Stunden wird der Niederschlag abgesaugt, mit Methanol gewaschen und getrocknet.

10

Ausbeute 2,1 g = 72 % d. Th.

Fp: 232 °C Zersetzung

15 NMR ( $d_6$ -DMSO)  $\delta$  = 11,58 ppm, s, 2H, OH  
7,38 ppm, m, 10H, aromat. H

Beispiel 2:

20 Bis-(5-Carboxy-benzimidazol-2-yl)-disulfid

Darstellung analog Beispiel 1 aus 2-Mercaptobenzimidazol-5-carbonsäure

25 Ausbeute 70 % d. Th.

Fp. 235 - 8 °C

30 NMR ( $d_6$ -DMSO)  $\delta$  = 9,4 ppm, d, NH  
7,4 - 8,4 ppm, m, aromat. H

- 25 -

Beispiel 3:Bis-(3-Carboxy-pyrid-2-yl)-disulfid

Darstellung analog Beispiel 1 aus 2-Mercaptopyridin-3-carbonsäure

Ausbeute: 56 % d. Th.

5

Fp: 206 °C

NMR ( $d_6$ -DMSO)  $\delta$  = 8,55 ppm, q, 2H

8,22 ppm, q, 2H

10

7,53 ppm, q, 2H

Beispiel 4:Bis-(5-Aminocarbonylmethyl-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)-

15

disulfid

Herstellung analog Beispiel 1 aus (5-Aminocarbonyl-methyl)-2-mercpto-4-methyl-1,3-thiazol

20

Ausbeute 92,1 %

Fp. 200 - 203 °C

NMR ( $d_6$ -DMSO)  $\delta$  = 7,33, br d, 4H  $\text{NH}_2$

25

3,62 s, 4H,  $\text{CH}_2$

2,26 s, 6H,  $\text{CH}_3$

Beispiel 5:

30 Bis-[4-(2-Chlorallyl)-6-hydroxy-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-3-yl]-disulfid

2,2 g 4-(2-Chlorallyl)-6-hydroxy-3-mercaptop-5-oxo-  
4,5-dihydro-1,2,4-triazin wurden in

25 ml Methanol gelöst, bei Raumtemperatur tropfen-  
weise mit

5 0,86 ml 35 %  $H_2O_2$  versetzt und 1 Stunde nachgerührt  
wobei das Produkt auskristallisierte. Es wurde  
abgesaugt, mit Methanol gewaschen und an der  
Luft getrocknet.

10 Ausbeute 1,2 g

Fp: 204 - 5 °C (Z)

NMR ( $d_6$ -DMSO)  $\delta$  = 12,7 ppm (br. s., OH)

15 5,5 ppm (dd, =  $CH_2$ )  
4,8 ppm (s,  $CH_2N$ )

Beispiel 6:

20 Bis-(6-Hydroxy-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1,2,4-triazin-3-yl)-disulfid

1,59 g 6-Hydroxy-3-mercaptop-2-methyl-5-oxo-2,5-  
dihydro-1,2,4-triazin wurden in

25 30 ml Methanol gelöst, bei Raumtemperatur tropfen-  
weise mit

0,43 ml 35 %  $H_2O_2$  versetzt und 30 Minuten nachgerührt.  
Die Lösung wurde mit Kohle geklärt, einrotiert

30 und der Rückstand mit Eiswasser verrieben.  
Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Eis-  
wasser gewaschen, an der Luft getrocknet,  
in Methanol suspendiert, abfiltriert, mit  
wenig Methanol gewaschen und im Vakuum getrock-  
net.

Ausbeute 0,8 g,

Fp: 220 °C (Z)

NMR ( $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 3,87 ppm (s,  $\text{CH}_3$ )

5 Beispiel 7:

Bis-(6-Hydroxy-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-3-yl)-disulfid

10 3,7 g 6-Hydroxy-3-mercaptop-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin wurden in  
400 ml Methanol und  
38 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  gelöst. Bei Raumtemperatur wurden  
2,5 ml 35 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  zugetropft. Nach 30 Minuten Rühren  
15 wurde auf 100 ml eingeengt, der Niederschlag abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute 1,5 g,

20 Fp: 237 °C  
NMR ( $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$ ):  $\delta$  = 3,67 ppm s, 2H, OH  
3,8 ppm, s, 6H,  $\text{CH}_3$

Beispiel 8:

25 Bis-(5-Carboxymethyl-4-methyl-thiazol-2-yl)-disulfid

23,62 g 5-Carboxymethyl-4-methyl-2-mercaptop-thiazol wurden in  
30 250 ml Methanol gelöst, filtriert und unter Wasserbadkühlung langsam mit  
12,5 ml 35 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  versetzt. Es wurden 30 Minuten im Wasserbad und 2 Stunden bei Raumtemperatur nachgerührt. Nach Filtration und Waschen  
35 mit Methanol wurden 22,8 g der Titelverbindung isoliert.

Fp: 162 °C

NMR (CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D):  $\delta$  = 2,6 ppm, s, 6H, CH<sub>3</sub>  
4,2 ppm, s, 4H, CH<sub>2</sub>

5

Beispiel 9:

Bis-(5-Carboxymethyl-1,3-thiazol-2-yl)-disulfid

10 0,88 g 2-Mercapto-1,3-thiazol-5-yl-essigsäure werden  
in ca. 10 ml Methanol gelöst und unter Rühren  
bei Raumtemperatur mit  
0,5 ml 33 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung versetzt. Nach 0,5 h wurde  
die Kristallsuspension gekühlt, filtriert  
15 und der Filterrückstand getrocknet. Ausbeute  
0,6 g vom Zersetzungspunkt 150 °C. Dünnschicht-  
chromatographischer Vergleich auf Merck-Sili-  
cagel-Platten zeigt vollständige Umsetzung  
(RF: 0,3; Laufmittel: Essigester: 65, Ethanol:  
20 25, Wasser: 10, Ameisensäure: 1)

Beispiel 10:

Bis-(4-Carboxymethyl-1,3-thiazol-2-yl)-disulfid

25 Setzt man  
1,75 g 4-Carboxymethyl-2-mercaptop-thiazol analog  
Beispiel 8 um, so erhält man 0,95 g der  
Titelverbindung.

30

Fp: 163 - 5 °C

NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 3,7 ppm, s, 4H, CH<sub>2</sub>

7,6 ppm, s, 2H, CH

35 9,4 ppm, s, 2H, CO<sub>2</sub>H

Beispiel 11Bis-(2-Carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-5-yl)-disulfid

1,4 g 2-Mercapto-1,3,4-thiadiazol-5-yl)mercaptopoessig-  
säure werden in 10 ml Methanol aufgelöst und  
5 unter Eiskühlung mit  
0,65 ml 35 %  $H_2O_2$  tropfenweise versetzt. Es wird 1  
Stunde bei Raumtemperatur nachgerührt und  
filtriert. Die Kristalle werden mit wenig  
Methanol nachgewaschen und im Vakuum getrocknet.

10 Ausbeute: 1,3 g,

Fp: 179 °C (Z)

15 NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 13 ppm, breit,  $CO_2$   
4,2 ppm, s,  $CH_2$

Beispiel 12:Bis-(5-Carboxy-1,3-thiazol-2-yl)-disulfid

21 g 2-Mercapto-thiazol-5-carbonsäure werden in  
100 ml Methanol unter leichtem Erwärmen gelöst. Unter  
Eiskühlung wird langsam mit  
25 10,7 ml 35 %  $H_2O_2$  versetzt und 45 Minuten bei Raum-  
temperatur nachgerührt. Es wird abgesaugt,  
mit Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute 21,5 g  
30 Fp: 280 °C (Z),

NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 8,48 ppm, s, Thiazol-H

Beispiel 13:Bis-(5-Carboxy-4-methyl-thiazol-2-yl)-disulfid

1,75 g (10 mmol) 4-Methyl-2-mercaptop-thiazol-5-carbonsäure werden in

50 ml Methanol aufgeschlämmt und unter Eiskühlung mit

5 0,86 ml 35 %  $H_2O_2$  versetzt. Die Lösung wird 1/2 Stunde bei 0 °C und 1 Stunde bei Raumtemperatur nachgerührt. Die gebildeten Kristalle werden abgesaugt mit wenig Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

10

Ausbeute 1,52 g, Fp: 240 - 1 °C (Z)

NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 2,6 ppm, s, CH<sub>3</sub>

Beispiel 14:

15

Bis-(4-Carboxymethyl-5-methyl-thiazol-2-yl)-disulfidStufe 14-Brompropionylsäuremethylester

20

22 g Propionylsäuremethylester werden in

60 g CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und tropfenweise mit

8,7 ml Br<sub>2</sub> in

30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt. Es wird 1 1/4 h bei Raumtemperatur nachgerührt, nochmals mit

25

0,66 ml Br<sub>2</sub> in

5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt und weitere 1 1/4 h gerührt.

Es wird 3 x mit je

50 ml H<sub>2</sub>O, 1 x mit

30 20 ml ges. NaHCO<sub>3</sub> und 2 x mit je

50 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengegt. Man erhält 38,6 g Öl.

Stufe 2(2-Mercapto-5-methyl-thiazol-4-yl)-essigsäuremethylester

30,1 g des Öls aus Stufe 1, gelöst in  
 80 ml Äthanol, werden zu einer Lösung von  
 24 g frisch bereitetem Ammoniumdithiocarbaminat  
 in  
 5 200 ml Äthanol /  
 200 ml  $H_2O$  bei Raumtemperatur zugetropft. Es wird  
 2 1/2 h nachgerührt und mit  
 7,5 ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach 1 Stunde  
 Nachrühren wird zur Trockne eingedampft und mit  
 10 200 ml  $CHCl_3/H_2O$  (1:1) versetzt. Es wird noch zweimal  
 mit  $H_2O$  gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und  
 eingeengt. Der fest Rückstand wird in Äther  
 aufgeschlämmt und abfiltriert.

15 Ausbeute 8,9 g,

Fp: 149 °C (Z)

NMR ( $d_6$ -DMSO) :  $\delta$  = 11 ppm, breit, SH

20 3,7 ppm, s,  $OCH_3$   
 3,5 ppm, s,  $CH_2$   
 2,1 ppm, s,  $CH_3$

Stufe 3

25

(2-Mercapto-5-methyl-thiazol-4-yl)-essigsäure

1,98 g Stufe 2 wurden unter Erwärmen in  
 20 ml Methanol gelöst. Es wurde 40 Min. bei Raumtem-  
 peratur nachgerührt, mit  
 30 50 ml  $H_2O$  versetzt, und mit HCl konz. auf pH 1,0  
 angesäuert. Nach 1 h Rühren unter Eiskühlung  
 wurde abgesaugt und mit Eiswasser chloridfrei

gewaschen. Trocknen im Vakuum über  $P_2O_5$  er-  
gaben 1,67 g.

NMR ( $d_6$ -DMSO):  $\delta = 13,9$  ppm, breit,  $CO_2H$   
5 3,5 ppm, s,  $CH_2$   
2,08 ppm, s,  $CH_3$

Stufe 4

10 Bis-(4-Carboxymethyl-5-methyl-thiazol-2-yl)-disulfid

430 mg Stufe 3 wurden in  
20 ml Methanol suspendiert und unter Erwärmung ge-  
löst. Bei Raumtemperatur wurden  
15 0,25 ml 35 %  $H_2O_2$  zugetropft und noch 1 h nachgeführt.  
Nach Einengen auf ca. 5 ml wurde filtriert,  
und mit wenig eisgekühltem Methanol gewaschen.

Ausbeute: 280 mg

20

NMR ( $d_6$ -DMSO):  $\delta = 3,65$  ppm, s,  $CH_2$   
2,37 ppm, s,  $CH_3$

Beispiel 15:

25

Bis-(5-Carboxymethyl-1,3-thiazol-2-yl)-disulfid

0,8 g 2-Mercapto-5-carboxymethyl-1,3-thiazol wurden  
in 10 ml Methanol gelöst und unter Rühren  
30 tropfenweise mit 0,5 ml 33 %iger  $H_2O_2$ -Lösung  
versetzt. Man ließ über Nacht röhren, und  
filtrierte das auskristallisierte Produkt  
ab.

- 33 -

Ausbeute 0,6 g vom Fp. 150 °C (Zers.), dünnenschichtchromatographisch einheitlich ( $R_f = 0,3$ ;  
Kieselgel; Laufmittel: Essigester, Ethanol,  
Wasser, Ameisensäure (60:25:15:1))

5

IR (KBr-Preßling):  $\nu = 1710 \text{ cm}^{-1}$  (COOH).

$^1\text{H-NMR}$  ( $d_6$ -DMSO):  $\delta$  (ppm): 3,8 (s,  $\text{CH}_2$ -Thiazol, 2H),  
7,6 (s, Thiazol-4H, 1H).

10

Beispiel 16:

Bis-(5-Methoxycarbonylmethyl-1,3-thiazol-2-yl)-disulfid

15 0,5 g 2-Mercapto-5-methoxycarbonylmethyl-1,3-thiazol wurden in 5 ml Methanol gelöst und unter Rühren tropfenweise mit 0,3 ml 33 %iger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung versetzt. Man ließ über Nachtrühen und filtrierte das auskristallisierte Produkt ab.

20 0,3 g vom Fp. 72 °C, dünnenschichtchromatographisch einheitlich auf Kieselgel mit Essigester als Laufmittel ( $R_f = 0,8$ ).

IR (KBr-Preßling):  $\nu = 1735 \text{ cm}^{-1}$  (COOCH<sub>3</sub>).

25

$^1\text{H-NMR}$  ( $d_6$ -DMSO):  $\delta$  (ppm): 3,6 (s,  $\text{CH}_2$ -Thiazol, 2H),  
3,7 (s, COOCH<sub>3</sub>, 3H),  
7,0 (s, Thiazol-4H, 1H).

Beispiel 17:Bis-(4-Carboxy-1,3-thiazol-5-yl)-disulfid

5 g Bis-(4-methoxycarbonyl-1,3-thiazol-5-yl)-disulfid wurden in 100 ml Methanol suspendiert. Dazu gab man eine Lösung von 1,5 g NaOH in 20 ml H<sub>2</sub>O und erhitzte 1 h unter Rückfluß. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde Methanol am Rotationsverdampfer abgezogen, die Wasserphase einmal mit wenig Essigester extrahiert und mit 2N HCl-Lösung sauer gestellt. Das Produkt wurde abfiltriert, getrocknet und aus Essigester umkristallisiert. Man erhält 10 2 g vom Fp. 154 °C.

IR (KBr-Preßling):  $\nu = 1680 \text{ cm}^{-1}$  (COOH)

<sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  (ppm), 8,6 (s, Thiazol-2H).

Die Beispiele 18 bis 22 wurden wie in Beispiel 1 beschrieben synthetisiert.

Beispiel 18:

Bis-(5-Acetylamino-1,3-thiazol-2-yl)-disulfid

1H-NMR ( $d_6$  - DMSO):

$\delta$  = 2,16 ppm (s, 6H,  $-\text{CH}_3$ ), 7,56 ppm (s, 2H, Thiazol-H), 11,6 ppm (br s, 2H,  $-\text{NH}-$ )

Beispiel 19:

Bis-(5-Acetylamino-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-disulfid

1H-NMR ( $d_6$  - DMSO):

$\delta$  = 2,20 ppm (s, 6H,  $-\text{CH}_3$ ), 12,84 ppm (br s, 2H,  $-\text{NH}-$ )

Beispiel 20:

Bis-(5-Glutarsäuremonoamido-1,3-thiazol-2-yl)-disulfid

1H-NMR ( $d_6$  - DMSO):

$\delta$  = 1,6 - 2,6 ppm (m, 12H, sechs  $\text{CH}_2$ -Gruppen), 7,50 ppm (s, 2H, Thiazol-H), 12,63 ppm (br s, 2H,  $-\text{NH}-$ ), 13,05 ppm (br s, 2H,  $-\text{CO}_2\text{H}$ )

Beispiel 21:

Bis-(5-Bernsteinsäuremonoamido-1,3-thiazol-2-yl)-disulfid

1H-NMR ( $d_6$  - DMSO):

$\delta$  = 2,4 - 2,7 ppm (m, 8H,  $-\text{CH}_2$ ), 7,50 ppm (s, 2H, Thiazol-H), 12,66 ppm (br s, 2H,  $-\text{NH}-$ ), 13,15 ppm (br s, 2H,  $-\text{CO}_2\text{H}$ )

Beispiel 22:

Bis-[5-(2-Carboxymethyl-1-yl)-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl]-disulfid

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{d}_6$  - DMSO):

$\delta$  = 2,27 ppm (s, 6H,  $-\text{CH}_3$ ), 2,55 ppm (d, 4H, Thiazol- $\text{CH}_2$ ),  
2,96 ppm (t, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CO}_2^-$ )

Beispiel 23:

Bis-[(5-Carboxymethyl-6-hydroxy-4-methyl)-pyrimidin-2-yl]-disulfid

4 g 5-Carboxymethyl-6-hydroxy-2-mercaptop-4-methylpyrimidin wurden in 200 ml 1 molarer Natriumhydrogencarbonatlösung gelöst und unter Eiskühlung mit 10 ml 35 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  tropfenweise versetzt. Es wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt und unter Eiskühlung mit 1 N HCl auf pH 2,0 ausgesäuert. Der Niederschlag wurde abgesaugt und ergab nach Trocknen 1,5 g der Titelverbindung.

Mp. 331°C (Zers.), IR 1630, 1700  $\text{cm}^{-1}$ .

$\delta$  = 2,5 ppm (s, 6H,  $-\text{CH}_3$ ), 3,26 ppm, (s, 4H,  $-\text{CH}_2$ )

Patentansprüche:

1. Verwendung von Disulfiden der allgemeinen Formel I

5

Het-S-S-Het

(I)

in der Het für einen gegebenenfalls substituierten 5- oder 6-gliedrigen Heterocyclus steht, bei der Herstellung eines Arzneimittels zur Immunstimulation, 10 Immunrestauration und zytostatischen Behandlung.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Verbindungen der Formel I verwendet werden, in der Het ein gegebenenfalls substituierter 5-gliedriger

15 Heterocyclus mit einem Schwefel- oder Sauerstoffatom und 1 bis 2 Stickstoffatomen oder mit 1 bis 4 Stickstoffatomen ist, wobei diese Heterocyclen auch benzokondensiert sein können, oder ein gegebenenfalls substituierter 6-gliedriger Heterocyclus mit 1 - 3 20 Stickstoffatomen, wobei diese Heterocyclen auch ganz oder teilweise hydriert sein können.

3. Pharmazeutisches Mittel zur Immunstimulation, Immunrestauration und zytostatischen Behandlung enthaltend 25 eine Verbindung der Formel I.

4. Pharmazeutische Mittel gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich noch eine oder mehrere 30 gegen Infektionen oder Tumorerkrankungen wirksame Substanzen enthalten.

5. Verwendung einer Verbindung der Formel I oder eines Mittels gemäß Ansprüchen 3 und 4 zur Immunstimulation, Immunrestauration und zytostatischen Behandlung.

35

6. Disulfide der allgemeinen Formel I'

Het'-S-S-Het'

(I')

5 in der Het' für einen gegebenenfalls substituierten 5-gliedrigen Heterocyclus mit einem Schwefelatom und 1 bis 2 Stickstoffatomen oder mit 1 bis 3 Stickstoffatomen steht, wobei diese Heterocyclen auch benzokondensiert sein können oder für einen gegebenenfalls substituierten 6-gliedrigen Heterocyclus mit 1 bis 3 Stickstoffatomen, wobei diese Heterocyclen auch ganz oder teilweise hydriert sein können.

7. Verfahren zur Herstellung der Disulfide der allgemeinen Formel I', dadurch gekennzeichnet, daß man

15 a) eine Verbindung der Formel II

Het'-SH

(II)

in der Het' die vorstehende Bedeutung hat, durch Umsetzung mit einem Oxidationsmittel in eine 20 Verbindung der Formel I' überführt oder

b) eine Verbindung der Formel III

Het'-X

(III)

25 in der Het' die vorstehende Bedeutung hat und X für eine reaktive, leicht abspaltbare Gruppe steht, mit  $\text{Me}_2\text{S}_2$  umsetzt, wobei Me für ein Alkalimetall steht, oder

c) eine Verbindung der Formel IV

Het'-S-SO<sub>2</sub>Me

(IV)

30 in der Het' und Me die vorstehenden Bedeutungen haben, mit Jod in wäßrigem Medium umsetzt und in den nach a), b) oder c) erhaltenen Verbindungen der Formel I' gegebenenfalls einen Substituenten des Heterocyclus Het' in an sich bekannter Weise in einen anderen Substituenten von Het' überführt.



Europäisches  
Patentamt

**EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT,**  
der nach Regel 45 des Europäischen Patent-  
Übereinkommens für das weitere Verfahren als  
europäischer Recherchenbericht gilt

**0194571**  
Nummer der Anmeldung

<b>EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE</b>			EP 86102901.5
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
X	US - A - 4 378 364 (D.R. GRASSETTI) * Zusammenfassung; Spalte 1, Zeile 22 - Spalte 3, Zeile 59; Beispiel 14 *	1-4, 6, 7	A 61 K 31/33 A 61 K 31/415 A 61 K 31/44 A 61 K 31/505 A 61 K 31/53 C 07 D 211/72 C 07 D 213/71 C 07 D 235/28 C 07 D 249/08 C 07 D 253/84 C 07 D 277/32 C 07 D 285/12 A 61 K 31/41 A 61 K 31/425 A 61 K 31/455 C 07 D 211/54 C 07 D 211/84 C 07 D 213/80 C 07 D 239/56 C 07 D 253/06
X	GB - A - 1 327 466 (MERCK & CO) * Ansprüche 1-10; Seite 1, Zeilen 27-46 *	1-3, 6	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
A	* Ansprüche 1-10; Seite 1, Zeilen 27-46 *	4, 7	A 61 K 31/41 A 61 K 31/425 A 61 K 31/455 C 07 D 211/54 C 07 D 211/84 C 07 D 213/80 C 07 D 239/56 C 07 D 253/06
X	US - A - 4 152 439 (D.R. GRASSETTI) * Spalte 1, Zeile 4 - Spalte 2, Zeile 29; Beispiele 9,10 *	1-3, 4, 6	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
	--		A 61 K 31/00
X	FR - A - 2 403 798 (W.H. RORER, INC.) * Anspruch 1 *	1-3, 6	
A	* Ansprüche 1,8,9 *	4	
	--		
<b>UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE</b>			
Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.			
Vollständig recherchierte Patentansprüche: 1-4			
Unvollständig recherchierte Patentansprüche: 6, 7			
Nicht recherchierte Patentansprüche: 5			
Grund für die Beschränkung der Recherche:			
Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers (siehe Art. 52(4) des Europäischen Patentübereinkommens)			
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 21-05-1986	Prüfer MAZZUCCO
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze			
E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			



## Europäisches Patentamt

## EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

**0194571**  
Nummer der Anmeldung

**Nummer der Anmeldung**

EP 86102901.5